

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K16288

研究課題名（和文）脳内の軸索再伸長をターゲットとしたアルツハイマー病の根本的治療法の開発

研究課題名（英文）Development of therapeutic strategy for Alzheimer's disease based on axonal regeneration in the brain

研究代表者

楊 熙蒙（Yang, Ximeng）

富山大学・学術研究部薬学・和漢系・助教

研究者番号：80818922

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：脳内でいったん萎縮した軸索（神経突起の一つ）を再伸長させることによって、アルツハイマー病に対する新規治療法を開発することを目指した。その結果、アルツハイマー病モデル（5XFAD）マウス脳内では記憶形成に関わる海馬 前頭前野間の軸索が萎縮しているが、薬物ジオスゲニンを投与すると本回路の軸索がつながるべき脳部位に再伸長することを初めて明らかにした。また、脳での軸索再伸長に重要な責任タンパク質として、SPARC及びGalectin-1を見出した。さらに、脳での軸索再伸長が確かに記憶回復に直接関わることを機能学的に証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの脳科学上の常識では、成体脳の軸索は再伸長することが難しいと考えられてきたが、本研究ではアルツハイマー病脳内の軸索が再伸長できる根拠と、本現象を担う責任タンパク質（SPARC, Galectin-1）を明らかにし、さらにこれを誘発できる薬物ジオスゲニンを初めて見出した。また、脳内での軸索再伸長が確かに記憶回復をもたらすことも明らかにした。これらは、脳内の軸索再伸長がアルツハイマー病をはじめとした神経変性疾患に対する新規治療戦略になりうることを示唆する知見である。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to develop a new therapeutic strategy for Alzheimer's disease (AD) by regenerating axons (one of the neurites) in the brain. We demonstrated that axons projecting from the hippocampus to the prefrontal cortex were atrophied in AD model (5XFAD) mice; however, diosgenin administration significantly promoted axonal regeneration in this neural circuit. In addition, SPARC and Galectin-1 were identified as responsible proteins for accurate axonal re-innervation in the brain. We also confirmed that axonal regeneration in the brain directly related to memory recovery in 5XFAD mice, suggesting the importance of repairing axons in AD treatment.

研究分野：神経薬理学、神経科学

キーワード：アルツハイマー病 軸索再伸長 記憶回復 Diosgenin SPARC Galectin-1

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病 (AD) では、脳内で amyloid β ($A\beta$) が沈着することによって、神経回路が破綻し、認知機能障害が引き起こされる。近年、認知症患者の急増は社会問題となっているが、臨床で用いられている承認薬 (コリンエステラーゼ阻害薬や NMDA 受容体拮抗薬) は、認知機能障害の進行を遅らせる対症療法にとどまっている。一方、AD の原因物質の除去を狙った $A\beta$ 抗体の開発が進められてきたが、脳内の $A\beta$ を減少させても認知機能は回復しないことが報告されており、原因物質の除去のみでは治療に十分ではないことが示唆された。この理由は、AD 発症よりも 20-30 年も前の無症状期から $A\beta$ が蓄積し始めており、それに伴って神経回路が進行性に変性していくため、発症後から原因物質を除去するだけでは既に破綻してしまった神経回路の修復が困難だからである。

そこで私は、AD の根本的治療には “一度破綻した脳の神経回路が再び形成される” ことが最も重要であると考えた。神経回路の形成には、神経細胞の軸索が投射先の神経細胞の樹状突起にシナプス結合する必要があるが、特に軸索は遠く離れた部位に向かって長く伸長しなければならない。しかし成体の脳においては、一度変性した軸索は再伸長できないと長年考えられてきたため、治療戦略としてほとんど着目されてこなかった。近年、成体脳においても軸索が近位には自発的に再伸長することが報告されたものの、軸索が遠く離れた正しい投射先に向かって再伸長するかどうかを評価するには至っておらず、これを達成できる薬物や脳内分子機序も見出されてこなかった。

2. 研究の目的

当研究グループでは、かねてより、培養神経細胞において $A\beta$ で萎縮した軸索を再伸長させ、家族性 AD モデル (5XFAD) マウスの記憶障害を回復させる薬物を探索してきた。その中でも、特に優れた軸索再伸長活性を示したのものとして、山薬中の成分 diosgenin を発見した。しかし、diosgenin の 5XFAD マウス脳内における軸索再伸長作用、及びそれに関連する分子メカニズムについては未解明であった。そこで本研究では、diosgenin 投与が 5XFAD マウス脳内の萎縮した軸索を遠く離れた投射先に向かって再伸長させるかどうかを検証するとともに、本現象に関与する神経細胞中での機能分子群を明らかにすることを目的とした。これにより、AD 脳内において軸索再伸長を引き起こす薬物候補と、それに関わる責任分子群を解明し、脳内の軸索再伸長をターゲットとした AD の根本的治療法の確立につなげることを目指した。

3. 研究の方法

(1) Diosgenin 投与による 5XFAD マウス脳内での軸索再伸長作用の評価

Diosgenin による脳内での軸索再伸長作用を評価するにあたり、記憶形成に関わる海馬から前頭前野に投射する神経回路に着目した。野生型マウス及び 5XFAD マウス (雌性、7-9 ヶ月齢) の前頭前野に赤色蛍光の逆行性トレーサー-Dextran Texas Red (3000 MW; 25 μ g) を注入後、溶媒 (オリーブオイル) または 0.1 μ mol/kg/day diosgenin を 14 日間連続で経口投与し、同一部位 (前頭前野) に緑色蛍光の逆行性トレーサー-Dextran FITC (3000 MW; 25 μ g) を注入し、その 7 日間後に脳を摘出した。脳切片を作製し、海馬 CA1 及び CA3 における Dextran Texas Red 陰性かつ Dextran FITC 陽性の神経細胞数を定量することで、diosgenin による軸索再伸長作用を評価した。

(2) 脳内での軸索再伸長に関わる責任分子の同定

(1) の脳切片より、軸索が伸長しなかった神経細胞 (Dextran Texas Red 陽性かつ Dextran FITC 陽性) と diosgenin 投与により軸索が再伸長した神経細胞 (Dextran Texas Red 陰性かつ Dextran FITC 陽性) 1 個 1 個をレーザーマイクロダイセクション法で、海馬切片より単離した。各神経細胞のプールより RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ (Mouse Clariom S Array) で遺伝子の発現量変化を網羅的に解析した。データ解析は Transcriptome Analysis console を用いて行った。

続いて、RNA レベルで発現量が顕著に変化した遺伝子について、タンパク質レベルでの発現量変化を評価するために、western blot を行った。胎生 14 日齢の ddY マウスより単離した海馬神経細胞を 3 日間初代培養し、溶媒 (0.1% EtOH) または 1 μ M diosgenin を 4 日間処置後、PBS で 1 回洗浄した lysate をサンプルとして用いた。

(3) 神経細胞特異的な遺伝子の過剰発現による軸索再伸長作用及び記憶回復作用の評価

(2) において、軸索が再伸長した神経細胞中で発現量が最も増加したタンパク質である SPARC 及び Galectin-1 について、神経細胞特異的に過剰発現する AAV9 ベクターを構築した。

まず、野生型マウス及び 5XFAD マウス (雌性、7-9 ヶ月齢) の両側海馬 CA1 に各 AAV9 を注入した。それぞれのタンパク質の過剰発現が認められた注入 21 日後より、物体認知記憶試験、空間記憶試験、及び自発運動試験の各種行動試験を行った。続いて、(1) と同様の要領で、2 色の逆行性トレーサーを順次前頭前野に注入し、海馬に各 AAV9 を注入することにより、5XFAD マウス脳内における軸索再伸長作用を評価した。

(4) 脳内での軸索再伸長と記憶回復の関係性の証明

DREADD システムを用いて、SPARC の過剰発現により 5XFAD マウスの海馬から前頭前野に軸索を再投射した神経細胞特異的にその興奮性活動を抑制するために、SPARC と共に hM4Di を過剰発現する AAV9 ベクターを構築し、5XFAD マウスの両側海馬 CA1 に注入した。また、海馬神経細胞の軸索投射部である前頭前野には、hM4Di 発現細胞の神経活動を一時的に抑制するために、1 mM clozapine-N-oxide (CNO) または negative control である生理食塩水を 0.3 μ l 微量注入した。物体認知記憶試験を行い、マウスの記憶への影響を検討した。

(5) 軸索が正しく再伸長するための脳内分子機構の解明

(1)-(4) において、脳内での軸索再伸長に重要であることが示されたタンパク質 (SPARC 及び Galectin-1) について、蛍光免疫染色により神経細胞中での局在を検討した。続いて、軸索再伸長時に SPARC 及び Galectin-1 と相互作用するタンパク質を探索し、それぞれの相互作用タンパク質ペアがどのように方向特異的な軸索再伸長に関わるかについて、詳細の分子機構を解明した。

4. 研究成果

まず、2 色の逆行性神経トレーサーを組み合わせた評価により、5XFAD マウスの脳内では海馬 CA1 及び CA3 から前頭前野に向かう軸索が萎縮していることと、diosgenin の経口投与が本回路の軸索を顕著に再伸長させることをそれぞれ示した。また、diosgenin 投与により海馬で軸索が再伸長した神経細胞中において、発現量が最も増加した遺伝子として SPARC (Secreted protein acidic rich in cysteine) 及び Galectin-1 (lectin, galactose binding soluble 1) を同定した。これら SPARC 及び Galectin-1 は、diosgenin 処置によってタンパク質レベルにおいても増加することを western blot 及び蛍光免疫染色で確認した。

AAV9 ベクターを用いて海馬神経細胞特異的に SPARC または Galectin-1 を過剰発現すると、5XFAD マウスの物体認知記憶及び空間記憶障害が回復し、海馬から前頭前野に投射する軸索の再伸長も促進されることが示された。また、DREADD システムを用いて、5XFAD マウスの海馬から前頭前野に軸索を再投射した神経細胞特異的に、その神経活動を抑制すると、SPARC 過剰発現によっていったん示された記憶回復作用が消失した。

さらに、軸索再伸長中の軸索では、特に軸索膜上で SPARC が増加することを蛍光免疫染色で確認した。SPARC の相互作用タンパク質の一つとして I 型 collagen が報告されているが、軸索に沿うように細胞外 I 型 collagen が並ぶこと、軸索が萎縮しても I 型 collagen は残ること、SPARC は細胞外 I 型 collagen をたどるように相互作用することで、元々伸びていた方向に再び軸索を伸長させることを明らかにした。Galectin-1 については、軸索の成長円錐膜上で高発現していたことから、Galectin-1 はその軸索がつながるべき脳部位より分泌される何らかの軸索誘導因子を感知する受容体様に働く可能性を考えた。そこで、海馬神経細胞の軸索投射先である前頭前野神経細胞からは分泌され、投射先ではない小脳神経細胞からは分泌されないタンパク質を銀染色で網羅的に探索したところ、Secernin-1 が同定された。Galectin-1 を過剰発現した海馬神経細胞の成長円錐側にのみ遊離型 Secernin-1 を処置すると、軸索長が増加した。また、遊離型 Secernin-1 と成長円錐膜上の Galectin-1 の共局在を蛍光免疫染色で、直接結合を共免疫沈降法で確認した。

以上より、diosgenin が 5XFAD マウス脳内の萎縮した軸索を、遠く離れた投射先へと再伸長させることを初めて見出した。また、SPARC と I 型 collagen、Galectin-1 と Secernin-1 がそれぞれ相互作用することが、本現象の基盤となっていることを明らかにした。さらに、海馬から前頭前野に軸索が再伸長することが、記憶障害回復の直接的要因であることが機能的に証明された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yang Ximeng, Tohda Chihiro	4. 巻 28
2. 論文標題 Diosgenin restores memory function via SPARC-driven axonal growth from the hippocampus to the PFC in Alzheimer's disease model mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Psychiatry	6. 最初と最後の頁 2398-2411
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41380-023-02052-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yang Ximeng, Tohda Chihiro	4. 巻 60
2. 論文標題 Axonal Regeneration Mediated by a Novel Axonal Guidance Pair, Galectin-1 and Secernin-1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Neurobiology	6. 最初と最後の頁 1250-1266
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12035-022-03125-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計31件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yang Ximeng, Tohda Chihiro
2. 発表標題 Identification of molecular mechanisms for accurate axonal regeneration in Alzheimer's disease model mouse brains
3. 学会等名 Society for Neuroscience 52th annual meeting (Neuroscience 2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 楊 熙蒙、東田 千尋
2. 発表標題 DiosgeninによるGalectin-1の増加は、アルツハイマー病モデルマウスにおいて脳での軸索再伸長と記憶回復を引き起こす
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yang Ximeng、Tohda Chihiro
2. 発表標題 Clarification of molecular mechanisms for axonal regeneration in the brains of Alzheimer ' s disease model mouse
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nagata Tomoya、Yang Ximeng、Tohda Chihiro
2. 発表標題 What factors contribute to diosgenin-induced memory recovery?
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 楊 熙蒙、東田 千尋
2. 発表標題 Matureニューロンの軸索伸長活性がdiosgeninによって高まる分子機構の解明
3. 学会等名 第39回和漢医薬学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 楊 熙蒙、東田 千尋
2. 発表標題 Diosgeninが脳での軸索再伸長と記憶回復を引き起こす分子メカニズムの解明
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会・第65回日本神経化学会大会・第32回日本神経回路学会大会合同学会 (NEURO2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 楊 熙蒙、東田千尋
2. 発表標題 Diosgeninによって軸索が再伸長し記憶が改善する分子メカニズムの解明
3. 学会等名 第2回和漢医薬学会 若手研究者フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東田 千尋, 楊 熙蒙, 稲田 祐奈
2. 発表標題 Diosgenin含有山薬エキスによる認知機能向上作用：マウスおよび健常人での検討
3. 学会等名 日本生薬学会第67回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tohda C, Inada Y, Yang X
2. 発表標題 Diosgenin-rich yam extract enhances cognitive function: a placebo-controlled, randomized, double-blind, crossover study of healthy adults.
3. 学会等名 第64回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yang X, Tohda C
2. 発表標題 Molecular mechanisms for long-distance axonal regeneration in the brain of Alzheimer 's disease model mouse.
3. 学会等名 第64回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東田 千尋, 楊 熙蒙, 稲田祐奈
2. 発表標題 Diosgeninによるアルツハイマー病脳内での軸索修復作用と臨床研究への展開
3. 学会等名 第94回日本生化学大会 シンポジウム「健康長寿社会に向けた和漢薬研究の新展開」(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yang X, Tohda C
2. 発表標題 Diosgenin is a candidate drug for stimulating axonal regeneration in the brain and recovering memory deficits in Alzheimer ' s disease.
3. 学会等名 第16回国際医薬伝統シンポジウム2021 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yang X, Tohda C
2. 発表標題 Diosgenin promotes long-distance axonal regeneration in the brain and recovers memory deficits in a mouse model of Alzheimer ' s disease.
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 楊 熙蒙, 東田 千尋
2. 発表標題 Diosgeninがアルツハイマー病モデルマウスの脳内で軸索を再伸長させる分子メカニズムの解明
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 楊 熙蒙、東田千尋
2. 発表標題 Diosgeninはアルツハイマー病の脳内において軸索を正しく再伸長させる
3. 学会等名 第37回和漢医薬学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 久保山友晴、楊 熙蒙、東田千尋
2. 発表標題 アミロイド による軸索変性に着目したアルツハイマー病予防・治療法の開発
3. 学会等名 第37回和漢医薬学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yang X., Tohda C.
2. 発表標題 Clarification of the mechanisms for diosgenin-induced accurate axonal regrowth in the brain of a mouse model of Alzheimer ' s disease.
3. 学会等名 第63回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 楊 熙蒙、東田千尋
2. 発表標題 Diosgeninはアルツハイマー病モデルマウスの脳内において軸索を再伸長させ記憶障害を改善する
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yang X., Tohda C.
2. 発表標題 Diosgenin improves memory deficits in a mouse model of Alzheimer ' s disease by promoting axonal regrowth in the brain.
3. 学会等名 Society for Neuroscience 49th annual meeting (Neuroscience 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yang X., Tohda C.
2. 発表標題 Diosgenin promotes proper axonal regrowth in the brain and recovers memory deficits in a mouse model of Alzheimer ' s disease.
3. 学会等名 Toyama Forum for Academic Summit on “ Dynamic Brain ”
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 楊 熙蒙, 東田千尋
2. 発表標題 山薬エキスによる記憶亢進作用の検討
3. 学会等名 第36回和漢医薬学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 楊 熙蒙
2. 発表標題 和漢薬成分diosgeninの基礎研究により見出されたアルツハイマー病の根本的治療への展望
3. 学会等名 第36回和漢医薬学会学術大会 若手シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yang X., Tohda C.
2. 発表標題 Diosgenin elicits axonal regrowth in the brain and improves memory deficits in a mouse model of Alzheimer ' s disease.
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学会大会合同学会 (NEURO2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yang X., Tohda C.
2. 発表標題 Long-distance axonal regeneration in the brain recovers memory deficits in a mouse model of Alzheimer ' s disease.
3. 学会等名 17th Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry (APSN2023) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 東田千尋, 楊 熙蒙, 稲田祐奈
2. 発表標題 Diosgeninによるアルツハイマー病の記憶改善～軸索再投射メカニズムの解明と臨床研究での検証～
3. 学会等名 第50回日本毒性学会学術年会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yang X., Tohda C.
2. 発表標題 Galectin-1 contributes to axonal regeneration in the brain and memory recovery in Alzheimer ' s disease model mice
3. 学会等名 第66回日本神経化学会大会・第64回日本神経病理学会総会学術研究会 合同学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 楊 熙蒙, 東田千尋
2. 発表標題 Diosgeninによる脳での軸索再伸長と記憶回復にはGalectin-1の増加が関与する
3. 学会等名 第40回和漢医薬学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 楊 熙蒙, 東田千尋
2. 発表標題 Diosgeninはアルツハイマー病脳内の軸索を再伸長させ記憶障害を回復する
3. 学会等名 第46回日本神経組織培養研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yang X., Tohda C.
2. 発表標題 Galectin-1-elicited axonal regeneration in the brains and memory recovery effects in Alzheimer ' s disease model mice.
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 楊 熙蒙
2. 発表標題 脳内での軸索再伸長に基づいたアルツハイマー病の新規治療戦略
3. 学会等名 第2回 神経化学会 若手KYOUEN (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 楊 熙蒙, 東田千尋
2. 発表標題 SPARCはアルツハイマー病モデルマウス脳内で軸索を正しく再伸長させ記憶障害を回復する
3. 学会等名 日本薬学会 第144年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 軸索伸展剤	発明者 東田 千尋、楊 熙蒙	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-139980	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------